

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DO PÓLEN DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)

Patrícia Rocha Gomes¹

Maria do Carmo Bassols Raseira²

Alseny Garcia²

João Baptista da Silva³

RESUMO

Sete diferentes meios de cultura foram testados para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen das cultivares de cebola Aurora e Petrolini. Os meios foram compostos por: açúcar, ácido bórico e nitrato de cálcio em diferentes composições. O experimento foi conduzido no Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS. O melhor meio, dentre os testados, foi o composto por 200 g.L⁻¹ de açúcar, 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 1g de ágar, para a germinação dos pólenes de ambas as cultivares estudadas. Não houve influência diferenciada deste meio na germinação do pólen das cultivares avaliadas.

Palavras-chave: açúcar, ácido bórico, nitrato de cálcio, meio de cultura.

ABSTRACT: IN VITRO GERMINATION VIABILITY OF ONION POLLEN (*Allium cepa* L.)

Seven different culture media for in vitro germination test of onion pollen cvs. Aurora and Petrolini were tested.

¹ Eng. Agr., MSc., Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Sementes na UFPel, Cx. Postal 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS.

² Eng. Agr., Dr., Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, CEP: 96001-970, Pelotas, RS.

³ Eng. Agr., Prof. Titular da UFPel-IFM, Cx. Postal 354, CEP: 96010-900 – Pelotas, RS.

The media included: sugar, boric acid, calcium nitrate in different concentrations. The experiment was carried out in the Breeding Laboratory of Embrapa Clima Temperado. The best medium, among the ones tested, contained: 200 g.L⁻¹ sugar, 50 mg.L⁻¹ boric acid and 1 g of agar. There wasn't differentiated influence of this culture medium on pollen germination of the evaluated cultivars.

Key words: *sugar, boric acid, calcium nitrate, culture media.*

INTRODUÇÃO

A partir do conhecimento da viabilidade dos grãos de pólen, através de testes adequados para sua determinação, entre eles o teste de germinação *in vitro*, amostras do mesmo podem ser avaliadas antes de serem utilizadas em cruzamentos, bem como após um determinado período de armazenamento.

Fatores importantes como aqueles intrínsecos ao próprio pólen, composição do meio de cultura, densidade de pólen no meio, temperatura de incubação, período de coleta do pólen (Stanley & Linskens, 1974), entre outros, podem influenciar a germinação *in vitro* do pólen de algumas espécies.

Mann & Woodbury (1969), ao avaliarem diversas composições do meio de cultura para germinação *in vitro* do pólen de duas linhagens de cebola (*Allium cepa* L.), coletado às nove e às quatorze horas e trinta minutos, verificaram que os níveis ideais de sacarose e de ácido bórico variaram de 10 a 15% e 50 a 100 mg.L⁻¹, respectivamente, em meio composto por 1% de ágar ou 1% de gelatina. A porcentagem média de germinação obtida ficou em torno de 70 a 80% não havendo diferença entre a germinação dos pólenes coletados nos dois horários do dia. A adição de 300 mg.L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.4H₂O, em meio com 1% de gelatina, aumentou a porcentagem de germinação da espécie para 100%.

Entretanto, Chang & Struckmeyer, em 1976, demonstraram que as condições ótimas para a germinação do pólen de duas linhagens macho-férteis em cebola foi em meio com 10% de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de H₃BO₃, 300 mg.L⁻¹ de Ca(NO₃).4H₂O, 100 mg.L⁻¹ de KNO₃, 200 mg.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O e 1% de ágar, com incubação a 24° C. Nessas condições não houve diferença significativa na porcentagem de germinação do pólen colhido às nove, ao meio dia e às quatorze horas (50,4%, 49,7% e 50,0%, respectivamente).

A capacidade germinativa da linhagem macho-fértil de cebola, cultivada em abril e maio de 1990, foi estudada nos seguintes meios de cultura: a) solução com 5% de sacarose; b) solução com 10% de sacarose e c) solução com 10% de sacarose, 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 0,5 g de ágar. A incubação do meio de cultura foi feita à temperatura ambiente (aproximadamente de 20 a 25° C) e em incubadora com controle de temperatura (25° C). A porcentagem de germinação do pólen, da linhagem cultivada em abril, foi de 90% em meio de solução com ácido bórico e incubação à temperatura ambiente (aproximadamente 22° C). Porém, a mesma linhagem cultivada em maio, apresentou germinação inferior a 30% em todos os meios testados. Mesmo baixa, a germinabilidade desta linhagem destacou-se, também, em meio de solução com ácido bórico (Lorenzon & Almeida, 1994).

Este trabalho teve por objetivo determinar a composição do meio de cultura, adequado para a germinação *in vitro* do pólen das cultivares de cebola Aurora e Petrolini.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS.

Para os ensaios experimentais, foram utilizadas as cultivares comerciais de *Allium cepa* L., Aurora e Petrolini, oriundas de campos de produção de sementes da Embrapa Clima Temperado e da Estação de Pesquisa e Produção de Rio Grande, pertencente à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO).

Para cada cultivar, foram coletadas, ao acaso, seis a sete umbelas com, aproximadamente, 50% das flores em estágio de flor aberta, nas plantas dos campos de produção de sementes e levadas ao laboratório.

A fim de facilitar a deiscência da nãtera e a coleta dos grãos de pólen, os escapos florais com as suas respectivas umbelas, foram colocados em *beakers* com água e mantidos, por um máximo de 72 horas, à temperatura ambiente (20°-25° C). Após este período, as anteras secas e deiscentes foram removidas para caixinhas de papel e, daí, para os recipientes de armazenamento. Essa transferência foi feita com auxílio de um pincel fino (número 0) de pêlo de camelo.

Os meios para germinação foram colocados em lâminas especiais, adaptadas para o teste de germinação *in vitro*. Esta adaptação consistiu de dois anéis de cano PVC (aproximadamente 16 mm de diâmetro, 2 mm de espessura e 5 mm de altura) colados com cola tipo Super Bonder, em lâmina para microscopia. Cada anel delimi-

tou uma câmara onde foi colocado o meio de cultura para a germinação dos pólenes (Mendes, 1994).

Os elementos componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno microondas até a dissolução completa do ágar. Cerca de quatro a cinco gotas do meio, ainda quente, foram colocadas nas duas câmaras das lâminas. Após a solidificação do meio, os grãos de pólen foram espargidos sobre o mesmo, com auxílio de um pincel. Cada câmara da lâmina foi coberta com lamínula e o conjunto colocado em placa de Petri, com fundo revestido com papel absorvente umedecido, que constituiu a câmara úmida para incubação, sendo as placas conservadas por três horas, em estufa tipo BOD, à temperatura de 24° ± 1° C.

A fim de verificar qual o meio de composição mais adequada para a germinação dos grãos de pólen, foram avaliados aqueles descritos na Tabela 1.

Após o período de secagem, os pólenes foram polvilhados sobre os diferentes meios de cultura, colocados nas lâminas adaptadas, para avaliação da porcentagem de germinação *in vitro*.

A contagem do número de grãos de pólen foi feita com auxílio de microscópio ótico, utilizando-se o método de varredura, a fim de obter-se uma amostra ao acaso. Foram contados todos os pólenes encontrados desde a parte superior esquerda da lâmina. Registrou-se, em um contador manual, os germinados e os não germinados até totalizar 100 unidades em cada anel da lâmina adaptada. Quando se observou uma grande diferença entre as duas contagens essas foram realizadas mais uma ou duas vezes. Foi considerado como germinado o grão de pólen que apresentou um comprimento de tubo polínico maior ou igual ao diâmetro do grão (Mann & Woodbury, 1969).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura para a germinação *in vitro* dos pólen das cultivares de cebola Aurora e Petrolini

Meio (Nº.)	H ₃ BO ₃ (mg.L ⁻¹)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (mg.L ⁻¹)	Açúcar Cristal (g.L ⁻¹)
1	-	-	150
2	50	-	150
3	100	-	150
4	100	300	150
5	-	-	200
6	50	-	200
7	100	-	200

Todos os meios têm 1 g.L⁻¹ de agar.

O experimento fatorial foi conduzido em esquema inteiramente casualizado, com quatro repetições, tendo como fatores meios de cultura, em sete níveis e cultivares, em dois níveis (Aurora e Petrolini). Para identificação do efeito dos diferentes componentes dos meios na germinação dos pólen, foi realizada uma análise de contrastes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variação para a porcentagem de germinação dos pólen de cebola, cvs. Aurora e Petrolini, mostrou diferenças altamente significativas ($\alpha = 0,01$) entre os meios de cultura. Dos sete meios testados, o de melhor resultado foi aquele composto por 200 g.L⁻¹ de açúcar cristal, 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃) e 1% de agar (Tabela 2). A porcentagem média de germinação neste meio foi significativamente superior ($\alpha = 0,05$) aos demais.

Pela análise dos três contrastes de interesse (C₁, C₂ e C₃), constatou-se que, com relação ao efeito das doses de açúcar cristal (C₁), a dose maior (200 g.) foi mais adequada para a germinação do pólen de cebola; que a adição de boro ao meio de cultura (C₂), através do ácido bórico,

também estimulou a germinação e a inclusão de cálcio (C₃), através de nitrato de cálcio hidratado, não melhorou a germinação do pólen desta espécie.

Segundo Raseira (1997), após testes realizados na Embrapa Clima Temperado, verificou-se que o efeito da sacarose p.a. e do açúcar cristal, na germinação *in vitro* do pólen de pessegueiro, é o mesmo, uma vez que estes açúcares se diferenciam apenas pelo processo de refinamento. Deste modo, com relação à dose de açúcar, os resultados estão de acordo com os de Ganeshan (1986) e com Kwan et al. (1969), que utilizaram no meio de cultura, para a germinação do pólen desta espécie, 200 g.L⁻¹ de sacarose. Entretanto, Mann & Woodbury (1969) verificaram que os níveis ideais de sacarose, para a germinação do pólen de cebola *in vitro*, variaram de 10 a 15%, sendo que os mesmos não estudaram níveis superiores a 150 mg.L⁻¹ de sacarose.

O açúcar, portanto, por sua propriedade osmótica e por ser uma fonte de energia para o crescimento do tubo polínico (Visser, 1955 e Kwack, 1965 citados por Galletta, 1983), provou ser importante para a germinação do pólen das duas cultivares testadas.

Pelos resultados obtidos, o boro constituiu-se num elemento essencial para a germinação do pólen das cultivares estudadas, estando os resultados de acordo com os obtidos por Mann & Woodbury (1969) e Kwan et al. (1969 a), os quais constataram que as concentrações ideais deste mineral, para a germinação *in vitro* do pólen de *Allium cepa*, variaram de 50 a 100 mg.L⁻¹. Segundo Snyder & Clausen (1974), a importância deste elemento está na sua ação catalítica na germinação e no crescimento do tubo polínico, sendo o mesmo negativamente correlacionado com a concentração de açúcar (Galletta, 1983).

Tabela 2 - Porcentagem média de germinação *in vitro*, nos sete meios de cultura, do pólen das cultivares de cebola Aurora e Petrolini

Nº.	Meios de cultura	Germinação (%)
6 -	200 mg.L ⁻¹ açúcar + 50 mg.L ⁻¹ H ₂ BO ₃	48,44 a
7 -	200 mg.L ⁻¹ açúcar + 100 mg.L ⁻¹ H ₂ BO ₃	40,35 b
3 -	150 mg.L ⁻¹ açúcar + 100 mg.L ⁻¹ H ₂ BO ₃	38,48 bc
5 -	200 mg.L ⁻¹ açúcar	35,66 bcd
2 -	150 mg.L ⁻¹ açúcar + 50 mg.L ⁻¹ H ₂ BO ₃	34,85 cd
4 -	150 mg.L ⁻¹ açúcar + 100 mg.L ⁻¹ H ₂ BO ₃ + 300 mg.L ⁻¹ Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	32,33 d
1 -	150 mg.L ⁻¹ açúcar	20,52 e

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan, com $\alpha = 0,05$.

Observou-se que a adição de 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico no meio de cultura com 200 g.L⁻¹ de açúcar, foi suficiente para a boa germinação dos pólenes de ambas as cultivares.

O cálcio foi incluído porque, quando adicionado ao meio de cultura, prende-se nas regiões de pectina da parede celular do tubo polínico, aumentando a rigidez desta, prevenindo o rompimento do tubo polínico durante o seu crescimento (Galletta, 1983). Porém, a adição de nitrato de cálcio hidratado, ao meio para germinação do pólen de cebola, não produziu resultados superiores àqueles meios só com boro e açúcar cristal, contrariando os resultados obtidos por Mann & Woodbury (1969), que utilizaram um meio de composição idêntica ao de nº. 4, composto por 150 g.L⁻¹ de açúcar, 100 mg.L⁻¹ de H₂BO₃ e 300 mg.L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.4H₂O, tendo apenas usado gelatina no lugar de agar.

Chang & Struckmeyer (1976) também adicionaram 300 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio hidratado ao meio de germinação para o pólen de cebola e, embora tenham utilizado outros componentes, além de uma fonte de açúcar e boro, esta concentração foi benéfica para a germinação do pólen de *A. cepa*.

Raseira & Raseira (1996) verificaram um efeito negativo na germinação do pólen de arcazeiro, pela inclusão de diferentes concentrações de cálcio ao meio composto por sacarose e ácido bórico. Os autores

concluíram que os resultados obtidos, pela adição deste mineral ao meio, não foram superiores àqueles meios só com sacarose e boro.

Para Snyder & Clausen (1974), geralmente, não são necessários outros minerais, além da sacarose e do ácido bórico, para os testes de rotina de germinação *in vitro*, entretanto, a adição ou não de outros elementos depende muito da espécie estudada.

CONCLUSÕES

O meio composto por 200 g.L⁻¹ de açúcar cristal, 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 1% de agar é o mais adequado, para a germinação dos grãos de pólen das cultivares de cebola Aurora e Petrolini. Não houve influência diferenciada deste meio na germinação do pólen das cvs. avaliadas.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, W.N.; STRUCKMEYER, B.E. Influence of temperature, time of day, and flower age on pollen germination, stigma receptivity, pollen tube growth

- and fruit set of *Allium cepa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon, v.101, n.1, p.81-83, 1976.
- GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORES, J.N.; JUNICK, J. **Methods in fruit breeding**. Indiana: Dale Griffith, 1983. p.23-35.
- GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196° C). **Tropical Agricultural**, India, v.63, n.1, p.46-48, 1986.
- KWAN, S.C.; HAMSON, A.R.; CAMPBELL, W.F. The effects of different chemicals on pollen germination and tube growth in *Allium cepa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon, v.94, n.6, p.561-562, 1969.
- LORENZON, M.C.A.; ALMEIDA, E.C. de Fertilidade do pólen de linhagem parentais da cebola híbrida (*Allium cepa* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.41, n.234, p.133-137, 1994.
- MANN, L.P.; WOODBURY, G.W. The effect of age, time of day and variety on pollen germination of onion, *Allium cepa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon v.94, n.2, p.102-104, 1969.
- MENDES, M. da S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** Pelotas: UFPel, 1994. 75p. Dissertação de Mestrado.
- RASEIRA, M. do C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1996. 95p.
- SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. In: SCHOPMEYER, C.S. **Seeds of woody plants in the United States**. Washington: USDA. Forest Service, 1974. p.75-97.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. New York: Springer Verlag, 1974. 307p.